



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K 49/00</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/17628</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Juni 1996 (13.06.96)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01465</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Oktober 1995 (10.10.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 44 45 065.6 7. December 1994 (07.12.94) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Rosa-Luxemburg-Strasse 16, D-16548 Glienicke (DE). SPECK, Ulrich [DE/DE]; Fürstendamm 20, D-13465 Berlin (DE). HILGER, Christoph-Stephan [DE/DE]; Ostender Strasse 3a, D-13353 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01465</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Oktober 1995 (10.10.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 44 45 065.6 7. December 1994 (07.12.94) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Rosa-Luxemburg-Strasse 16, D-16548 Glienicke (DE). SPECK, Ulrich [DE/DE]; Fürstendamm 20, D-13465 Berlin (DE). HILGER, Christoph-Stephan [DE/DE]; Ostender Strasse 3a, D-13353 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01465</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Oktober 1995 (10.10.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 44 45 065.6 7. December 1994 (07.12.94) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Rosa-Luxemburg-Strasse 16, D-16548 Glienicke (DE). SPECK, Ulrich [DE/DE]; Fürstendamm 20, D-13465 Berlin (DE). HILGER, Christoph-Stephan [DE/DE]; Ostender Strasse 3a, D-13353 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p>(54) Title: IN-VIVO DIAGNOSTIC PROCESS BY NEAR INFRARED RADIATION</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IN-VIVO-DIAGNOSTIK MITTELS NIR-STRAHLUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>An <i>in-vivo</i> diagnostic process by near infrared radiation (near I.R. radiation) uses water-soluble dyes and their biomolecular addition products having certain photophysical and pharmacochemical properties as contrasting agents for fluorescence and transillumination diagnosis in the near infrared range. Also disclosed are new dyes and pharmaceuticals containing the same.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur <i>In-vivo</i>-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung) unter Verwendung von wasserlöslichen Farbstoffen und deren Biomolekül-Addukten mit bestimmten photophysikalischen und pharmakochemischen Eigenschaften als Kontrastmittel in der Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik im NIR-Bereich, neue Farbstoffe und diese enthaltende pharmazeutische Mittel.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Verfahren zur In-vivo-Diagnostik
mittels NIR-Strahlung**

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur In-vivo-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung) unter Verwendung von wasserlöslichen Farbstoffen und deren Biomolekül-Addukten mit bestimmten photophysikalischen und pharmakochemischen Eigenschaften als Kontrastmittel in der Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik im NIR-Bereich, neue Farbstoffe und diese enthaltende pharmazeutische Mittel.

Die Erkennung von Krankheiten ist zu einem wesentlichen Teil davon abhängig, inwieweit es gelingt, Informationen über Strukturen und deren Veränderungen aus den primär nicht zugänglichen tieferen Schichten der Gewebe zu erlangen. Dies kann neben Tasten, Freilegen oder Punktieren durch die modernen bildgebenden Verfahren, wie Röntgen, die Magnetresonanztomographie oder die Ultraschalldiagnostik geschehen.

25

Da biologisches Gewebe eine relativ hohe Durchlässigkeit für langwelliges Licht des Wellenlängenbereiches von 650 - 1000 nm besitzt, steht dem Diagnostiker hiermit ein völlig anderes Verfahren zur bildlichen Gewebedarstellung zur Verfügung. Die Tatsache, daß nahinfrarotes Licht Gewebe bis zu mehreren Zentimetern durchdringen kann, wird in der Transilluminationsbildgebung genutzt. Diese Technik erlaubt bisher die Diagnose von Entzündungen der Nasennebenhöhlen und Kiefernhöhlen oder den Nachweis von Flüssigkeitsansammlungen oder Blut in oberflächennahen Geweberegionen (Beuthan J., Müller G.;

35

Infrarotdiaphanoskopie, Med. Tech. 1 (1992) 13-17).

- Versuche zur Erkennung von Brusttumoren verliefen bisher unbefriedigend (Navarro, G.A.; Profio, A.E.; Contrast in diaphanography of the breast; Med. Phys. 150 (1988) 181-187; Aspegren, K.; Light Scanning Versus Mammography for the Detection of Breast Cancer in Screening and Clinical Practice, Cancer 65 (1990) 1671-77), versprechen aber aufgrund neuester gerätetechnischer Entwicklungen
- besseren Erfolg (Klingenbeck J.; Laser-Mammography with NIR-Light, Gynäkol.-Geburtsh.-Rundsch. 33 Suppl.1 (1993) 299-300); Benaron D.A.; Optical Imaging reborn with technical advances, Diagnostic Imaging (1994) 69-76).
- Neben der Detektion der nicht absorbierten Strahlung kann auch die nach Bestrahlung mit nahinfrarotem Licht emittierte Fluoreszenzstrahlung gewebespezifische Informationen liefern. Diese sogenannte Autofluoreszenz wird genutzt, um atherosklerotisches von normalem Gewebe zu unterscheiden (Henry, P. D. et al., Laser-Induced Autofluorescence of Human Arteries, Circ. Res. 63 (1988) 1053-59).

Das wesentliche Problem bei der Nutzung von nahinfraroter Strahlung ist die außerordentlich starke Streuung des Lichtes, so daß selbst bei unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften sich ein scharf begrenztes Objekt von seiner Umgebung nur unscharf abzeichnet. Das Problem nimmt mit wachsender Entfernung von der Oberfläche zu und kann als hauptsächlicher limitierender Faktor sowohl bei der Transillumination als auch bei der Detektion von Fluoreszenzstrahlung angesehen werden.

Zur Verbesserung der Differenzierung zwischen normalem und erkranktem Gewebe können geeignete Fluoreszenzfarbstoffe beitragen, die sich im erkrankten Gewebe

(insbesondere Tumoren) anreichern und ein spezifisches Absorptions- und Emissionsverhalten besitzen. Die durch Absorption des Farbstoffes bewirkte Änderung des (gestreuten) eingestrahlten Lichtes oder die durch die Anregerstrahlung induzierte Fluoreszenz wird detektiert und liefert die eigentlichen gewebespezifischen Informationen.

Beispiele für die Anwendung von Farbstoffen für die In-vivo-Diagnostik beim Menschen sind die Verfolgung im Blut mit photometrischen Methoden zur Erkennung von Verteilungsräumen, Blutfluß oder Stoffwechsel- und Ausscheidungsfunktionen, sowie die Sichtbarmachung durchsichtiger Strukturen des Auges (Ophthalmologie).

Bevorzugte Farbstoffe für diese Anwendungen sind das Indocyaningrün und das Fluorescein (Googe, J.M. et al., Intraoperative Fluorescein Angiography; Ophthalmology, 100, (1993), 1167-70).

Indocyanin-Grün (Cardiogreen) wird zur Messung von Leberfunktion, Herzzeit- und Schlagvolumen, sowie von Organ- und peripherer Durchblutungen verwendet (L. Med. 24(1993)10-27) und als Kontrastmittel zur Tumordetektion erprobt. Indocyanin-Grün bindet zu 100% an Albumin und wird in der Leber freigesetzt. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist in wäßrigem Milieu gering. Die LD₅₀ (0,84 mmol/kg) ist ausreichend hoch, es können jedoch starke anaphylaktische Reaktionen hervorgerufen werden.

Indocyanin-Grün ist in Lösung instabil und kann nicht in salzhaltigen Medien appliziert werden, da es zur Ausfällung kommt.

Für die Lokalisation und Abbildung von Tumoren wurden bisher die für eine Anwendung in der Photodynamischen Therapie (PDT) konzipierten Photosensibilisatoren (u.a. Hämatoporphyrinderivate, Photophrin II, Benzoporphyrine,

Tetraphenylporphyrine, Chlorine, Phthalocyanine)
verwendet (Bonnett R.; New photosensitizers for the
photodynamic therapy of tumours, SPIE Vol. 2078 (1994)).
Die aufgeführten Verbindungen haben den gemeinsamen
5 Nachteil, daß sie im Wellenlängenbereich von 650 - 1200
nm nur eine mäßige Absorption aufweisen. Die für die PDT
erforderliche Phototoxizität ist für rein diagnostische
Zielstellungen störend. Weitere Schriften zu dieser
Thematik: U.S.-PS 4945239; WO 84/04665, WO 90/10219, DE-
10 OS 4136769, DE-PS 2910760.

In der U.S.-PS 4945239 werden zahlreiche apparative
Anordnungen zur Detektion von Brustkrebs mittels
Transillumination beschrieben und als kontrasterhöhende
15 Absorptionsfarbstoffe das bekannte Fluorescein,
Fluorescamin und Riboflavin genannt. Diese Farbstoffe
haben den gemeinsamen Nachteil, daß sie im sichtbaren
Wellenlängenbereich von 400-600 nm, in welchem die
Lichtdurchlässigkeit von Gewebe sehr gering ist,
20 absorbieren.

In der DE-OS 4136769 ist eine Apparatur zur Fluoreszenz-
detektion von mit fluoreszierenden Substanzen
angereicherten Gewebebereichen beschrieben. Die
25 Substanzen sind Bacteriochlorophyll und Derivate, sowie
Naphthalocyanine. Diese Strukturen zeichnen sich durch
Absorptionen im Bereich von 700-800 nm mit Extinktions-
koeffizienten von bis zu $70000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ aus. Die hier
aufgeführten Verbindungen besitzen neben den Fluoreszenz-
30 eigenschaften die Fähigkeit, durch Bestrahlung Singulett-
sauerstoff zu generieren und dadurch zytotoxisch zu
wirken (Photosensibilatoren für die photodynamische
Therapie). Diese photosensibilisierende Wirkung ist für
ein reines, wirkungsfreies Diagnostikum in höchstem Maße
35 unerwünscht.

Darüberhinaus ist die Synthese der Bacteriochlorophyll-
verbindungen zudem aufwendig und teuer, da Naturprodukte
als Ausgangssubstanzen erforderlich sind; die
Naphthalocyanine zeichnen sich oft durch eine sehr
5 geringe Photostabilität aus. Die bekannten Verbindungen
dieser Klassen sind schlecht wasserlöslich, die Synthese
einheitlicher, hydrophiler Derivate ist aufwendig.

WO 84/04665 beschreibt ein In-vivo-Verfahren zur
10 Fluoreszenzdetektion von Tumoren unter Verwendung der
Photosensibilisatoren Hämatoporphyrin und -derivat (Hp
und HpD), Uro- und Copro- und Protoporphyrin und
zahlreicher mesosubstituierter Porphyrine, sowie der
Farbstoffe Riboflavin, Fluorescein, Acridin-Orange,
15 Berberinsulfat und von Tetracyclinen. Die oben genannten
photophysikalischen und pharmakochemischen Anforderungen
werden von den genannten Substanzen nicht erfüllt.

Folli et al., Cancer Research 54, 2643-2649 (1994),
20 beschreiben einen mit einem Cyaninfarbstoff verbundenen
monoklonalen Antikörper, der zum Nachweis eines subkutan
implantierten Tumors verwendet wurde. Der Nachweis tiefer
gelegener pathologischer Prozesse macht allerdings die
Verwendung weiter verbesserter Farbstoffe erforderlich.
25 Ferner lassen höhere Farbstoffdosierungen die Verwendung
von Antikörpern als Träger aufgrund zu erwartender
Nebenwirkungen als ungeeignet erscheinen.

Cyanin-Farbstoffe und damit verwandte Polymethinfarb-
30 stoffe finden auch als Bestandteile photographischer
Schichten Verwendung. Solche Farbstoffe benötigen keine
Lumineszenzeigenschaften. Cyaninfarbstoffe mit
Lumineszenz-(Fluoreszenz-)eigenschaften sind für die
Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie und Durchfluß-
35 zytometry synthetisiert und an Biomoleküle gekoppelt
worden, z. B. Verbindungen mit Iodacetylgruppen als

spezifische Marker für Sulfhydrylgruppen von Proteinen (Waggoner, A.S. et al.; Cyanine dye Labeling Reagents for Sulfhydryl Groups, Cytometry, 10, (1989), 3-10). Auf diese Weise werden Proteine markiert und isoliert.

- 5 Weitere Literaturbeispiele: Cytometry 12 (1990) 723-30; Anal. Lett. 25 (1992) 415-28; Bioconjugate Chem. 4 (1993) 105-11.

- 10 In der DE-OS 39 12 046 von Waggoner, A.S. wird ein Verfahren zur Markierung von Biomolekülen mit Cyanin- und verwandten, wie Merocyanin- und Styrylfarbstoffen, die mindestens eine Sulfonat- oder Sulfonsäuregruppierung enthalten, beschrieben. Die erwähnte Schrift betrifft ein ein- sowie zweistufiges Markierungsverfahren in einem
15 wäßrigen Medium, wobei eine kovalente Reaktion zwischen Farbstoff und Amin-, Hydroxy-, Aldehyd- oder Sulfhydrylgruppe auf Proteinen oder anderen Biomolekülen stattfindet.

- 20 DE-OS 3828360 betrifft ein Verfahren zur Markierung von Antitumor-Antikörpern, speziell Melanom- und Kolonkarzinomspezifischer Antikörper, mit Fluorescein und Indocyanin-Grün für ophthalmologische Zielstellungen. Die Bindung von Indocyanin-Grün an Biomoleküle ist nicht
25 kovalent (Farbstoff-Antikörperkombination, Mischung).

- Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur In-vivo-Diagnostik mittels NIR-Strahlung weisen somit eine Reihe von Nachteilen auf, durch welche deren Anwendung in
30 der breiten medizinischen Diagnostik bisher unmöglich war.

- Die direkte Verwendung von sichtbarem Licht oder NIR-Strahlung ist auf oberflächennahe Körperbereiche
35 beschränkt, was mit der starken Streuung des eingestrahelten Lichtes zusammenhängt.

Der Zusatz von Farbstoffen zur Verbesserung des Kontrastes und des Auflösungsvermögens ruft jedoch eine Reihe weiterer Probleme hervor. Es sind nämlich an diese Farbstoffe Maßstäbe anzulegen, welche allgemein für Diagnostika gelten. So dürfen solche Stoffe, da diese meist in höheren Dosen, auch über einen längeren Diagnosezeitraum verabfolgt werden, nur eine geringe Toxizität aufweisen. Ferner müssen diese für die Diagnose geeigneten Farbstoffe gut wasserlöslich und hinreichend, d. h. mindestens während der Diagnosedauer, chemisch und photophysikalisch stabil sein. Auch ist eine Stabilität bezüglich der Metabolisierung im Organismus anzustreben.

Bisher stehen weder Farbstoffe mit solchen Eigenschaften noch ein geeignetes Verfahren zur In-vivo-Diagnostik mittels NIR-Strahlung zur Verfügung.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur In-vivo-Diagnostik zu schaffen, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur In-vivo-Diagnostik mittels NIR-Strahlung, zur Verfügung gestellt wird, bei dem Verbindungen der allgemeinen Formel I



30 worin

l für eine Zahl 0 - 6, n für eine Zahl 0 - 10 und
m für die Zahl 1 - 100 steht,

35 B eine biologische Erkennungseinheit mit einem Molekulargewicht bis zu 30000, welche sich an bestimmte Zellpopulationen oder spezifisch an

Rezeptoren bindet oder sich in Geweben oder Tumoren anreichert oder überwiegend im Blut verbleibt oder ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül ist,

5

F einen Farbstoff darstellt, welcher Absorptionsmaxima im Bereich von 650 bis 1200 nm aufweist,

10

W eine hydrophile Gruppe darstellt, welche die Wasserlöslichkeit verbessert, wobei der n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der Verbindung der Formel I kleiner oder gleich 2,0 ist unter der Maßgabe, daß $l = 0$ ist

15

sowie deren physiologisch verträgliche Salze verwendet werden.

20

Für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignete Verbindungen der allgemeinen Formel I sind solche, in denen beispielsweise B eine Aminosäure, ein Peptid, CDR (complementarity determining regions), ein Antigen, ein Hapten, ein Enzymsubstrat, ein Enzym-Cofaktor, Biotin, ein Carotinoid, ein Hormon, ein Neurohormon, ein Neurotransmitter, ein Wachstumsfaktor, ein Lymphokin, ein Lectin, ein Toxin, ein Kohlenhydrat, ein Oligosaccharid, ein Polysaccharid, ein Dextran, ein Oligonucleotid oder ein rezeptorenbindendes Arzneimittel ist.

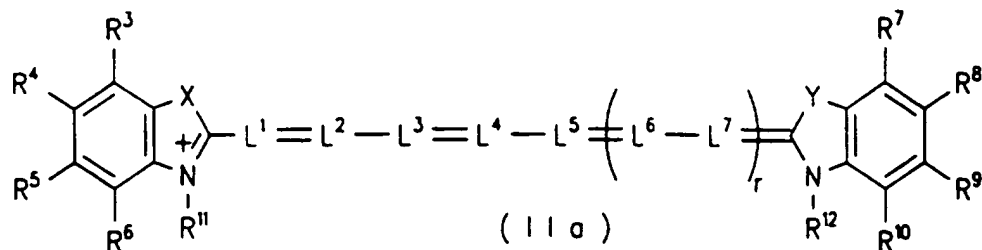
25

30

Für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignete Verbindungen der allgemeinen Formel I sind ferner solche, in denen beispielsweise F

einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel IIa

35



darstellt,

worin

5 r die Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet, mit der Maßgabe,
daß für $r = 2$ die jeweiligen doppelt vorkommenden
Fragmente L^6 und L^7 gleich bzw. unterschiedlich
sein können,

10 L^1 bis L^7 gleich oder unterschiedlich sind und
unabhängig voneinander ein Fragment CH oder CR
darstellen,

wobei

15 R ein Halogenatom, eine Hydroxy-, Carboxy-,
Acetoxy-, Amino-, Nitro-, Cyano- oder
Sulfonsäure-Gruppe oder ein Alkyl-, Alkenyl-,
Hydroxyalkyl-, Carboxyalkyl-, Alkoxy-,
Alkoxycarbonyl-, Sulfoalkyl, Alkylamino-,
Dialkylamino- oder Halogenalkyl-Rest mit bis
zu 6 Kohlenstoffatomen, ein Aryl-, Alkylaryl-,
20 Hydroxyaryl-, Carboxyaryl-, Sulfoaryl-,
Arylamino-, Diarylamino-, Nitroaryl- oder
Halogenaryl-Rest mit bis zu 9

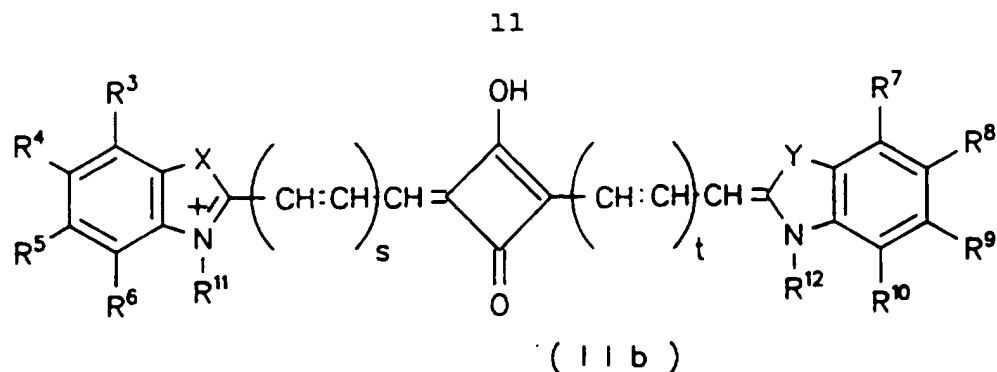
Kohlenstoffatomen ist

25 oder wobei R eine Bindung darstellt, welche
an einen anderen Rest R bindet und zusammen
mit den dazwischen liegenden Resten L^1 - L^7
einen 4- bis 6-gliedrigen Ring bildet
oder wobei R an zwei verschiedenen Positionen
jeweils eine Bindung darstellt, welche über
30 ein Fragment -CO- verbunden sind,

5 R^3 bis R^{12} gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Rest B oder W mit der oben angegebenen Bedeutung, oder ein Alkyl-Rest oder Alkenyl-Rest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder ein Aryl- oder Aralkyl-Rest mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen ist, wobei der Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder Aralkylrest gegebenenfalls mit einem Rest W mit der oben angegebenen Bedeutung substituiert ist,
10 oder wobei an jeweils zwei einander benachbarten Resten R^3 bis R^{10} unter Berücksichtigung der dazwischenliegenden C-Atome 5- bis 6-gliedrige Ringe anneliert sind, welche gesättigt, ungesättigt oder aromatisch sind und
15 gegebenenfalls einen Rest R mit der oben angegebenen Bedeutung tragen,

20 X und Y gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander ein O, S, Se oder Te bedeuten oder ein Fragment $-C(CH_3)_2-$, $-CH=CH-$ oder $-CR^{13}R^{14}-$ darstellen,
wobei R^{13} und R^{14} unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Rest B oder W mit der oben angegebenen Bedeutung oder ein Alkyl-Rest oder ein Alkenyl-Rest mit bis zu 6
25 Kohlenstoffatomen oder ein Aryl- oder Aralkyl-Rest mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen ist,
wobei der Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder
30 Aralkylrest gegebenenfalls mit einem Rest W mit der oben angegebenen Bedeutung substituiert ist,

35 einen Squarain-Farbstoff der allgemeinen Formel II b



darstellt
worin

5

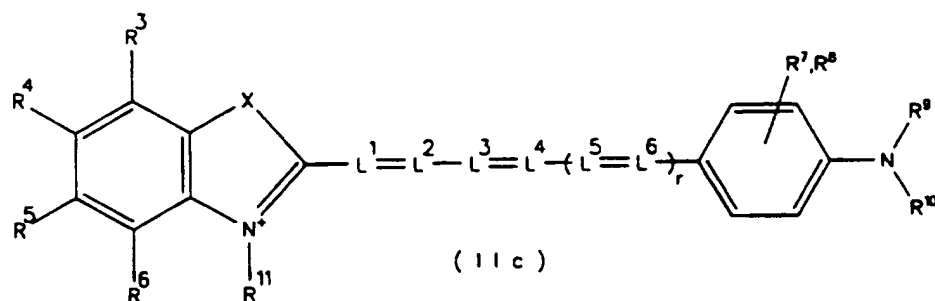
s und t unabhängig voneinander für die Ziffern 0 oder 1 stehen, mit der Maßgabe, daß s und t nicht gleichzeitig 1 bedeuten,

10

R³ bis R¹², x und y die oben angegebene Bedeutung haben

einen Styryl-Farbstoff der allgemeinen Formel II c

15



20

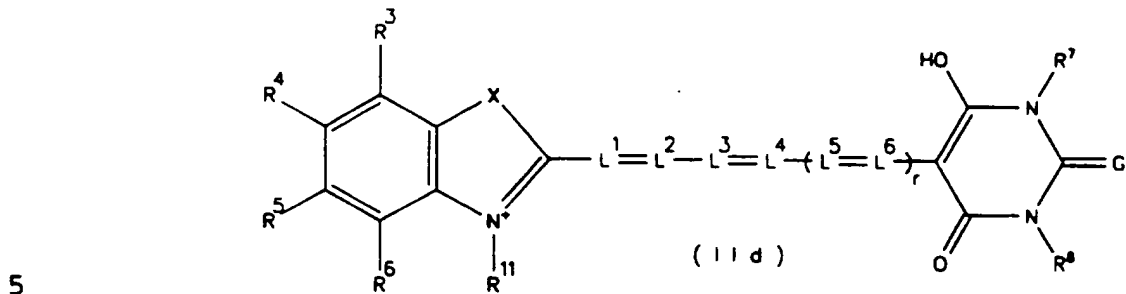
darstellt,

worin

r, L¹ bis L⁶, R³ bis R¹¹ und X die oben
angegebene Bedeutung haben,

25

oder einen Merocyanin-Farbstoff der allgemeinen Formel II d



darstellt,

10

worin

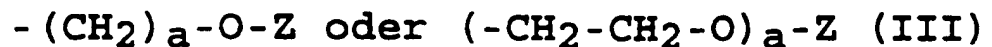
r, L¹ bis L⁶, R³ bis R⁸, R¹¹ und X die oben angegebene Bedeutung haben und G ein Sauerstoff- oder Schwefelatom darstellt.

15

Für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignete Verbindungen der allgemeinen Formel I sind solche, in denen W eine Carboxy- oder Sulfonsäure-Gruppe oder eine Carboxyalkyl-Gruppe oder eine Alkoxycarbonyl-Gruppe oder eine Alkoxyoxoalkyl-Gruppe mit bis zu 12 Kohlenstoffatomen ist,

20

einen Rest der allgemeinen Formeln III



25

bedeutet,

worin

a für die Zahl 0 bis 6 steht

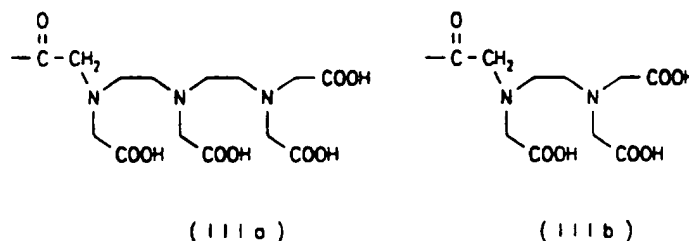
Z ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest mit 3

30

bis 6 C-Atomen, welcher 2 bis n-1 Hydroxygruppen aufweist, wobei n die Anzahl der C-Atome ist oder

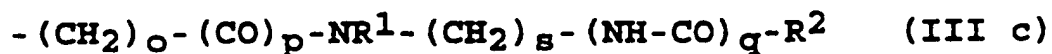
ein mit 2 bis 4 Hydroxygruppen substituierter
Aryl- oder Aralkylrest mit 6 bis 10 C-Atomen oder
ein mit 1 bis 3 Carboxygruppen substituierter
Alkylrest mit 1 bis 6 C-Atomen oder ein mit 1 bis
3 Carboxylgruppen substituierter Arylrest mit 6
bis 9 C-Atomen oder ein mit 1 bis 3
Carboxygruppen substituierter Aralkylrest oder
ein Nitroaryl bzw. ein Nitroaralkylrest mit 6 bis
15 C-Atomen oder ein Sulfoalkylrest mit 2 bis 4
C-Atomen bedeutet,

oder einen Rest der allgemeinen Formeln III a
oder III b



darstellt

oder einen Rest der allgemeinen Formel III c



bedeutet,

worin

o und s unabhängig voneinander für die Zahlen
0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 stehen,

p und q unabhängig voneinander 0 oder 1

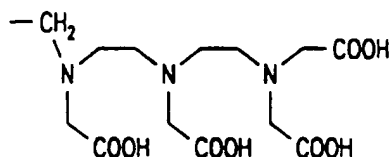
bedeuten,

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen

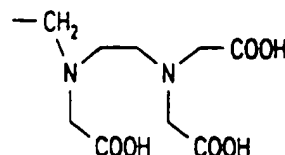
Rest Z mit der oben angegebenen Bedeutung mit

Ausnahme der Substituenten der allgemeinen Formeln III a und III b stehen oder unabhängig voneinander für einen Rest der allgemeinen Formeln III d oder III e

5



(III d)



(III e)

10 stehen, unter der Maßgabe, daß p und q = 1 sind,

oder ein Rest der allgemeinen Formel III c mit der oben angegebenen Bedeutung ist.

15

Die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Verbindungen zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Wellenlängenbereich von 650 bis 1200 nm absorbieren und fluoreszieren, Absorptionskoeffizienten von ca. 100 000
 20 l mol⁻¹ cm⁻¹ und höher und, soweit Fluoreszenz erwünscht ist, Fluoreszenzquantenausbeuten größer 5%, eine ausreichende Wasserlöslichkeit, Verträglichkeit und In-vitro- und In-vivo- sowie Photostabilität besitzen. Sie werden in möglichst kurzer Zeit möglichst vollständig
 25 wieder ausgeschieden. Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen sind leicht synthetisch und preisgünstig in möglichst wenigen Reaktionsstufen aus käuflich erhältlichen Ausgangsmaterialien zugänglich.

30

Erfindungsgemäß wird den Geweben bei der Durchführung des Verfahrens zur In-vivo-Diagnostik eine oder mehrere der

Substanzen gemäß der allgemeinen Formel I z. B. durch intravenöse Injektion zugeführt und Licht aus dem sichtbaren bis nahinfraroten Bereich von 650 bis 1200 nm eingestrahlt. Die nicht absorbierte Strahlung und die Fluoreszenzstrahlung wird einzeln oder beide gleichzeitig oder beide gegeneinander zeitverzögert registriert. Aus den erhaltenen Daten wird ein synthetisches Bild erzeugt.

Die Aufnahme von Fluoreszenzbildern kann nach unterschiedlichen Methoden erfolgen. Bevorzugt sind die Methoden, bei denen das Gewebe großflächig bestrahlt und die Fluoreszenz-Information örtlich aufgelöst durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera dargestellt wird oder die abzubildenden Gewebeareale mit einem in einen optischen Lichtleiter eingebündelten Lichtstrahl abgetastet und die erhaltenen Signale rechnerisch in ein Bild umgesetzt werden. Das Licht wird schmalbandig im Bereich der Absorptionsmaxima bzw. Fluoreszenzanregungswellenlängen der erfindungsgemäßen Verbindungen eingestrahlt. Die nicht absorbierte Strahlung kann ebenfalls in der beschriebenen Weise detektiert und die erhaltenen Signale verarbeitet werden.

Einstrahl- und Beobachtungswinkel sind nach den anatomischen Gegebenheiten und dem optimalen Kontrast von Fall zu Fall wählbar. Durch Subtraktion der Bilder vor und nach der Farbstoffgabe ist die Empfindlichkeit der Methode weiter zu verbessern. Durch Auswertung des Zeitverlaufs der farbstoffbedingten Veränderungen können für die Diagnostik nützliche Zusatzinformationen gewonnen werden.

Die meßtechnischen Verfahren sind dem Fachmann geläufig. Dem Fachmann ist ferner bekannt, welche apparativen Parameter zu wählen sind, um bei vorgegebener Absorptions bzw. Fluoreszenzwellenlänge der erfindungsgemäße

verwendeten Farbstoffe der allgemeinen Formel I, optimale Aufzeichnungs- und Auswertungsbedingungen zu erzielen.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Verbindungen der allgemeinen Formel I decken durch die variable strukturelle Natur des Farbstoffsystems F einen weiten Anregungs- und Emissionswellenlängenbereich ab. Es besteht die Möglichkeit, Produkte mit Anregungswellenlängen zu erhalten, die einer besonderen Anregungsquelle, z. B. einem Diodenlaser, entsprechen und somit an eine vorgegebene Meßapparatur bzw. gerätetechnische Komponente angepaßt sind.

Mittels der beschriebenen Techniken lassen sich selbst kleine Objekte von wenigen mm³ Volumen in tieferen Schichten der Gewebe oder in nicht transparenten Körperflüssigkeiten orten. Es bleibt aufgrund der Lichtstreuung und der damit verbundenen begrenzten Auflösung schwierig, die genaue Form und Größe der Objekte zu bestimmen, was für einige wichtige diagnostische Fragestellungen auch nicht erforderlich ist.

Überraschenderweise ergab eine nach Applikation eines Cyaninfarbstoffes durchgeführte Fluoreszenzlichtaufnahme einer Nacktmaus mit einer CCD-Kamera eine Fluoreszenzintensität, die um das tausendfache höher war, als bei einem entsprechend dosierten Porphyrin.

Das beschriebene Verfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen eignet sich besonders zur bildlichen Darstellung von nicht pathologisch verändertem Gewebe, systemischen Erkrankungen, Tumoren, Blutgefäßen, artherosklerotischen Plaques und der Perfusion und Diffusion.

Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen werden auf unterschiedliche Weise in das Gewebe eingebracht. Besonders bevorzugt ist die intravenöse Gabe der Farbstoffe.

5

Die Dosierung kann entsprechend dem Zweck der Anwendung sehr unterschiedlich sein. Ziel ist eine erkennbare Farbstoffkonzentration im zu diagnostizierenden Gewebebereich, wozu meist eine Konzentration von 1-100 $\mu\text{g/ml}$ im Gewebe oder in Körperflüssigkeiten ausreichend ist. Dieses Ziel wird bei direkter Injektion in kleine Körperhöhlen oder kleine Blut- oder Lymphgefäße im allgemeinen durch Verabreichung von 0,1-100 mg des betreffenden Farbstoffes enthalten in 0,1 bis 10 ml Trägerflüssigkeit erreicht. Bevorzugt sind in diesem Falle 1 bis 10 mg Farbstoff. Zur Anfärbung der Blutgefäße oder zur Erkennung spezieller Gewebe oder Strukturen nach intravenöser Injektion sind meist höhere Dosierungen (größer gleich 100 mg) erforderlich. Die obere Grenze der Dosierung ist nur durch die Verträglichkeit der jeweiligen Substanzen und Zubereitungen gegeben.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Verbindungen des Typs $B_1-(F-W_n)_m$, bei denen F ein Farbstoff aus der Klasse der Polymethinfarbstoffe, insbesondere Cyaninfarbstoffe, darstellt. Es können jedoch auch Merocyanin-, Styryl-, Oxonolfarbstoffe und Squariliumfarbstoffe verwendet werden. W bedeutet ein Strukturelement, das maßgeblich zur Hydrophilie des Gesamtmoleküls beiträgt. Besonders bevorzugt sind Verbindungen, bei welchen 1 für die Zahl 0 steht und deren n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient kleiner 2 ist (n-Octanol/0,01 M TRIS-Puffer mit 0,9 % Kochsalz, auf pH 7,4 eingestellt, beide Phasen gegeneinander gesättigt).

Eine biologische Erkennungseinheit B ist beispielsweise eine Aminosäure, ein Peptid, ein CDR (complementarity determining regions), ein Antigen, ein Hapten, ein Enzymsubstrat, ein Enzym-Cofaktor, Biotin, ein Carbotinoid, ein Hormone, ein Neurohormon, ein Neurotransmitter, ein Wachstumsfaktor, ein Lymphokin, ein Lectin, ein Toxin, ein Kohlenhydrat, ein Oligosaccharid, ein Polysaccharid, ein Dextran, ein gegenüber Nukleasen stabilisiertes Oligonukleotid oder ein rezeptorbindendes Arzneimittel.

Verbindungen aus den vorgenannten Gruppen können beispielsweise Oxytocine, Vasopressine, Angiotensine, melanocyten-stimulierende Hormone, Somatostatine, tyrotropin-freisetzende Hormone, gonadotropin-freisetzende Hormone, Testosterone, Estradiole, Progesterone, Cortisole, Aldosterone, Vitamin D, Gastrine, Secretine, Somatropine, Insuline, Glucagone, Calcitonine, wachstumshormone-freisetzende Hormone, Prolactine, Enkephaline, Dopamine, Norepinephrine, Serotonine, Epinephrine, Interleukine, Angiogenine, Thymopoietine, Erythropoietine, Fibrinogene, Angiotensinogene, Mecamylamin, Ranitidin, Cimetidin, Lovastatine, Isoproterenol-Derivate oder Transferrin sein.

Durch Wahl der biologischen Erkennungseinheit ermöglichen diese Substanzen eine Anreicherung in bestimmten Teilen des Körpers aufgrund verschiedener Mechanismen. Diese Mechanismen beinhalten eine Bindung an extrazelluläre Strukturen, die Anreicherung durch unterschiedliche biologische Transportsysteme, die Erkennung von Zelloberflächen oder die Erkennung intrazellulärer Komponenten.

Erfindungsgemäß zu verwenden sind ferner Verbindungen, bei denen B ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül ist, wie z. B. Polylysin, Polyethylenglykol, Methoxypolyethylenglycol, Polyvinylalkohol, Dextran, Carboxydextran oder eine kaskadenpolymerartige Struktur an F kovalent gebunden ist.

In den erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen der allgemeinen Formel I bedeutet Alkyl-, Aryl- oder Aralkylrest mit Hydroxygruppen beispielsweise 2-Hydroxyethyl-, 2-Hydroxypropyl-, 3-Hydroxypropyl-, 4-Hydroxybutyl-, 2,3-Dihydroxypropyl-, 1,3-Dihydroxyprop-2-yl-, Tris-(Hydroxymethyl)-methyl-, 1,3,4-Trihydroxybut-2-yl-Glucosyl-, 4-(1,2-Dihydroxyethyl)phenyl- oder 2,4-, 2,5-, 3,5- oder 3,4-Dihydroxyphenyl-Reste.

Ein Alkyl-, Aryl- oder Aralkylrest mit 1 - 3 Carboxygruppen kann beispielsweise ein Carboxymethyl-, Carboxyethyl-, Carboxypropyl-, Carboxybutyl-, 1,2-Dicarboxyethyl-, 1,3-Dicarboxypropyl-, 3,5-Dicarboxyphenyl-, 3,4-Dicarboxyphenyl-, 2,4-Dicarboxyphenyl oder 4-(1,2-Dicarboxyethyl)-phenyl-Rest sein.

Unter einem Sulfoalkylrest ist bevorzugt ein 2-Sulfoethyl-, 3-Sulfopropyl- und ein 4-Sulfobutylrest zu verstehen.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen, bei denen W die Position von R^4 bzw. R^8 , R^6 bzw. R^{10} sowie R^{11} oder R^{12} einnimmt, als auch doppelt an den Positionen R^3/R^5 bzw. R^7/R^9 vorhanden ist.

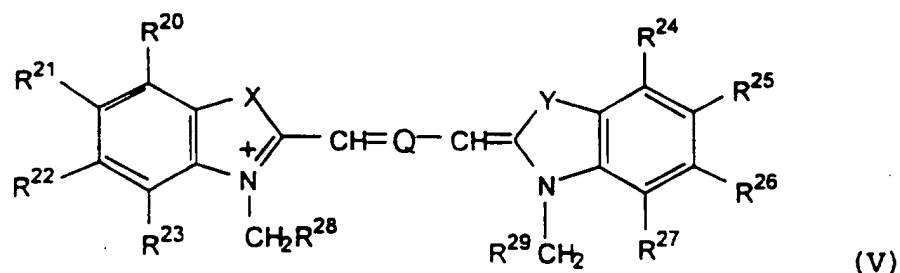
Die erfindungsgemäß verwendeten Farbstoffe absorbieren im Spektralbereich von 650 nm bis 1200 nm. Die Absorptionskoeffizienten der Verbindungen sind ca. 100000

l mol⁻¹ cm⁻¹ und größer bezogen auf ein Farbstoffmolekül.
Die Fluoreszenzquantenausbeuten sind größer als 5% bei
Farbstoffen, die für die Fluoreszenzbildgebung verwendet
werden.

5

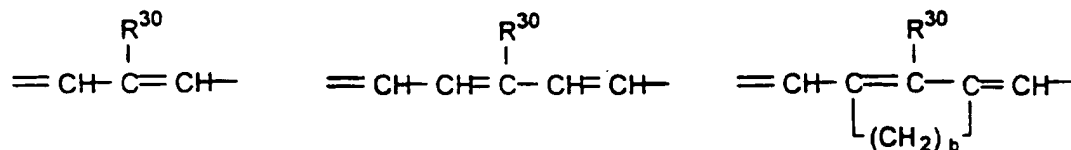
Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind
Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel V.

10

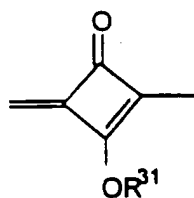


wobei

Q ein Fragment



oder



15

ist,

20

wobei R³⁰ für ein Wasserstoffatom, eine
Hydroxygruppe, eine Carboxygruppe, einen
Alkoxyrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder ein
Chloratom steht, b eine ganze Zahl 2 oder 3
bedeutet, R³¹ für ein Wasserstoffatom oder einen
Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht,

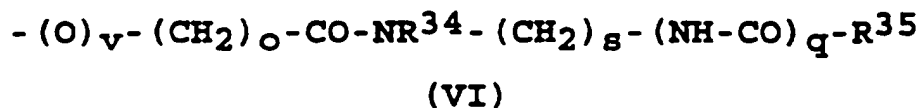
25

X und Y unabhängig voneinander für ein Fragment

-O-, -S-, -CH=CH- oder -C(CH₂R³²)(CH₂R³³)- stehen,

R²⁰ bis R²⁹, R³² und R³³ unabhängig voneinander für
 ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, einen
 Carboxy-, einen Sulfonsäure-Rest oder einen
 Carboxyalkyl-, Alkoxycarbonyl oder Alkoxyoxoalkyl-
 Rest mit bis zu 10 C-Atomen oder ein Sulfoalkylrest
 mit bis zu 4 C-Atomen

oder für ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül
 oder für einen Rest der allgemeinen Formel VI



steht,

mit der Maßgabe, daß bei der Bedeutung von X und Y
 gleich O, S, -CH=CH- oder -C(CH₃)₂- mindestens einer
 der Reste R²⁰ bis R²⁹ einem nicht spezifisch
 bindenden Makromolekül oder der allgemeinen Formel VI
 entspricht,

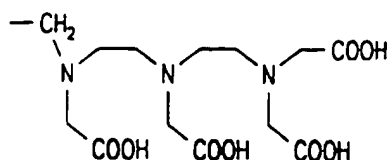
wobei

o und s gleich 0 sind oder unabhängig voneinander
 für eine ganze Zahl von 1 bis 6 stehen,

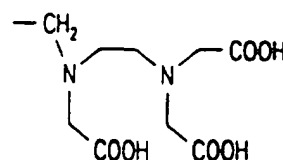
q und v unabhängig voneinander für 0 oder 1
 stehen,

R³⁴ ein Wasserstoffatom oder einen Methylrest
 darstellt,

R³⁵ ein Alkylrest mit 3 bis 6 C-Atomen, welcher 2
 bis n-1 Hydroxygruppen aufweist, wobei n die
 Anzahl der C-Atome ist, oder ein mit 1 bis 3
 Carboxygruppen substituierter Alkylrest mit 1 bis
 6 C-Atomen, Arylrest mit 6 bis 9 C-Atomen oder
 Arylalkylrest mit 7 bis 15 C-Atomen, oder ein
 Rest der allgemeinen Formel IIIId oder IIIe



(III d)



(III e)

ist,

unter der Maßgabe, daß q für 1 steht,

5 oder ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül bedeutet,

10 R²⁰ und R²¹, R²¹ und R²², R²² und R²³, R²⁴ und R²⁵,
R²⁵ und R²⁶, R²⁶ und R²⁷ zusammen mit den zwischen
ihnen liegenden Kohlenstoffatomen einen 5- oder 6-
gliedrigen aromatischen oder gesättigten annelierten
Ring bilden,
sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

15 In den erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen
Formel V haben die Alkyl-, Aryl- oder Aralkylreste
mit Hydroxy- oder Carboxygruppen die zuvor als
bevorzugt erwähnten Bedeutungen.

20 Besonders bevorzugte Cyaninfarbstoffe sind

25 5-[2-[(1,2-Dicarboxyethyl)amino]-2-oxoethyl]-2-[7-[5-
[2-(1,2-dicarboxyethyl)amino]-2-oxoethyl]-1,3-
dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfoethyl)-2H-indol-2-
yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-
sulfoethyl)-3H-indolium, inneres Salz,
Monokaliumsalz,

30 2-[7-[5-[2-[(11-Carboxy-2-oxo-1,4,7,10-tetraaza-
4,7,10-tri(carboxymethyl)-1-undecyl)amino]-2-
oxoethyl]-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-ethyl-2H-indol-

2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, inneres Salz,

5 2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-5-[2-[(Methoxypolyoxyethylen)-amino]-2-oxoethyl]-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-[2-[(methoxypolyoxyethylen)amino]-2-oxoethyl]-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz,

10 2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-(Methoxypolyoxyethylen)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz,

15 3-(3-Carboxypropyl)-2-[7-[3-(3-carboxypropyl)-1,3-dihydro-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz,

20 2-[[3-[[3-(3-Carboxypropyl)-1,3-dihydro-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]methyl]2-hydroxy-4-oxo-2-cyclobuten-1-yliden]methyl]-1,1-dimethyl-3-ethyl-1H-benz(e)indolium, inneres Salz,

25 2-[7-[1,3-Dihydro-5-[2-[(2,3-dihydroxypropyl)amino]-2-oxoethyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-5-[2-[(2,3-dihydroxypropyl)amino]-2-oxoethyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz

30

Eine wesentliche Eigenschaft der erfindungsgemäßen Verbindungen und der erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen besteht darin, daß sie eine durch einen n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von kleiner 2,0 gekennzeichnete Hydrophilie besitzen (Verteilungskoeffizient n-Octanol / 0,01 M TRIS-Puffer mit 0,9 % Kochsalz,

35

auf pH 7,4 eingestellt, beide Phasen gegeneinander gesättigt). Die Verbindungen besitzen keine ausgeprägten, für ein reines Diagnostikum unerwünschten photosensibilisierenden bzw. phototoxischen Eigenschaften. Sie sind
5 weiterhin gut verträglich und werden ausgeschieden.

Durch diese Eigenschaft grenzen sich die Verbindungen von den bisher bekannten, für die In-vivo-Diagnostik vorgeschlagenen oder verwendeten Farbstoffen ab. Die
10 Fluoreszenzquantenausbeuten, die besonders bei Cyaninfarbstoffen in wäßrigen Medien durch Aggregation drastisch absinken, sind vergleichbar mit den in apolaren Lösungsmitteln gemessenen, da durch die erhöhte
15 Wasserlöslichkeit und den Raumanspruch der hydrophilen Gruppen eine Aggregat- und Micellenbildung unterdrückt wird.

Die Proteinaffinität einer Gruppe der bevorzugten Verbindungen ist gering, das pharmakokinetische Verhalten
20 entspricht in etwa dem von beispielsweise Insulin oder Saccharose.

Überraschenderweise zeigte sich, daß auch bei diesen Verbindungen trotz des einfachen Molekulaufbaus eine
25 diagnostisch ausreichende Anreicherung in bestimmten Strukturen im Organismus, z.B. auch in Tumoren erfolgt und nach Gleichverteilung des Farbstoffes im Organismus die Elimination aus den Tumorbereichen im Vergleich zum umliegenden Gewebe verzögert stattfindet.

30 Die Verträglichkeit der Substanzen ist sehr hoch. Besonders bevorzugt sind Substanzen mit LD₅₀-Werten größer 0,5 mmol/kg Körpergewicht bezogen auf ein einzelnes Farbstoffmolekül.

35

Die erfindungsgemäßen und erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen zeichnen sich durch eine hohe In-vitro- und In-vivo-, sowie Photostabilität aus. Bei Stehenlassen einer wäßrigen Lösung in tagesbelichteten Räumen sind bei
5 den besonders bevorzugten Verbindungen nach 2 Tagen 98 % und nach 12 Tagen 70 % unverändert.

Die beschriebenen photophysikalischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen und
10 erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen unterscheiden sich auch von denen des einzigen zur Anwendung am Patienten zugelassenen Cyaninfarbstoffes, dem Indocyanin-Grün (Cardiogreen).

15 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen die l-Werte von B größer oder gleich 1, vorzugsweise 1 oder 2 sind.

Es ist die Synthese von Cyaninfarbstoffen möglich, die
20 bei Wellenlängen von 650 bis 1200 nm mit hohen Extinktionskoeffizienten absorbieren und in hoher Effizienz fluoreszieren. Die Synthese der erfindungsgemäßen und erfindungsgemäß verwendeten Cyaninfarbstoffe erfolgt überwiegend in Anlehnung an literaturbekannte
25 Methoden, beispielsweise F.M. Hamer in The Cyanine Dyes and Related Compounds, John Wiley and Sons, New York, 1964; Cytometry 10 (1989) 3-10; 11 (1990) 418-430; 12 (1990) 723-30; Bioconjugate Chem. 4 (1993) 105-11, Anal. Biochem. 217 (1994) 197-204; Tetrahedron 45 (1989) 4845-
30 66, European Patent Appl. 0 591 820 A1.

Die Darstellung der erfindungsgemäß verwendeten Farbstoff-Biomolekül-Addukte der allgemeinen Formel I erfolgt durch Umsetzung einer nach bekannten, oben
35 zitierten Methoden dargestellten Verbindung F-Wn mit einer biologischen Erkennungseinheit B.

Dazu muß die Verbindung F-W_n mindestens eine, vorzugsweise genau eine Gruppierung enthalten, die gegenüber einer Amin-, Hydroxy-, Aldehyd- oder Sulfhydrylgruppe auf den biologischen Erkennungseinheiten kovalent reaktiv ist. Solche Gruppierungen sind literaturbekannt und u. a. in DE-OS 39 12 046 beschrieben.

Besonders bevorzugt sind die Gruppierungen Isothiocyanat, Isocyanat und Hydroxysuccinimidester bzw. Hydroxysulfosuccinimidester, die gegenüber Aminofunktionen reaktiv sind und eine Thioharnstoff-, Harnstoff- und Amidbrücke bilden, sowie die Gruppierungen Halogenacetyl und Bernsteinsäureimid, die gegenüber Sulfhydrylgruppen reaktiv sind und eine Thioetherbrücke gebildet wird.

Weiterhin können Carboxygruppen mit Alkoholfunktionen unter Verwendung geeigneter Aktivierungsreagenzien (z .B. DCC) Esterverknüpfungen oder Etherstrukturen bilden, sowie Aldehydfunktionen mit Hydrazinen zu Iminstrukturen führen.

Die erwähnten reaktiven Gruppierungen werden an die erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß verwendeten Farbstoffe der allgemeinen Formel I oder an deren synthetische Vorläufer angefügt oder vorhandene Funktionalitäten in die Reaktivgruppierungen überführt. Die Reaktivgruppierungen können direkt am Farbstoffsystem oder über sogenannte Linkerstrukturen (z. B. Alkylketten, Aralkylstrukturen) gebunden sein.

Die Umsetzung von F-W_n mit den biologischen Erkennungseinheiten B erfolgt vorzugsweise in DMF oder wäßrigem Medium oder DMF/Wassergemischen bei pH-Werten von 7,4 bis 10. Das molare Verhältnis zwischen Farbstoff- und

Biomolekül (Beladungsgrad) wird absorptionsspektroskopisch bestimmt. Nicht gebundene Bestandteile werden chromatographisch oder durch Filtration abgetrennt.

- 5 In gleicher Weise lassen sich Makromoleküle, welche die geeigneten Funktionalitäten besitzen, an die Farbstoffe koppeln.

- 10 Die Substanzen können sehr unterschiedliche Eigenschaften haben. Das Molekulargewicht kann zwischen wenigen Hundert bis größer als 100000 betragen. Die Substanzen können neutral oder elektrisch geladen sein. Bevorzugt sind Salze saurer Farbstoffe mit physiologisch verträglichen Basen, wie Natrium, Methylglutamin, Lysin oder Salze mit
15 Lithium, Calcium, Magnesium, Gadolinium als Kationen.

- Die erhaltenen Farbstoff-Biomoleküladdukte erfüllen die oben beschriebenen photophysikalischen, toxikologischen, chemischen und wirtschaftlichen Anforderungen in
20 hervorragender Weise.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Cyaninfarbstoffen der allgemeinen Formel V zur In-vivo-Diagnostik mittels NIR-Strahlung,
25 entsprechend der Verwendung der Verbindungen nach der allgemeinen Formel I.

- Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner auch diagnostische Mittel, welche Verbindungen der
30 allgemeinen Formel V oder I enthalten.

- Diese Mittel werden nach den dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt, ggf. unter Verwendung üblicher Hilf- und/oder Trägerstoffe sowie Verdünnungsmittel und
35 dergleichen. Dazu gehören physiologisch verträgliche Elektrolyte, Puffer, Detergenzien und Substanzen zur

Anpassung der Osmolalität sowie zur Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit, wie beispielsweise Cyclodextrine. Durch die in der Pharmazie gebräuchlichen Maßnahmen ist für die Sterilität der Zubereitungen bei
 5 der Herstellung und insbesondere vor der Applikation zu sorgen.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

10 Beispiel 1:

Darstellung von

5-[2-[(1,2-Dicarboxyethyl)amino]-2-oxoethyl]-2-[7-[5-[2-(1,2-dicarboxyethyl)amino]-2-oxoethyl]-1,3-dihydro-3,3-
 15 dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, inneres Salz, Monokaliumsalz

Aus 5-Carboxymethyl-2-[7-[5-carboxymethyl-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, inneres Salz, Monokaliumsalz wird nach bekannten
 20 Verfahren der Di-N-Hydroxysuccinimid-Ester dargestellt (Cytometry 11 (1990) 418-430).

25 Zu einer Lösung von 0,5 g (0,51 mmol) des Disuccinimidylesters in 5 ml DMF werden 0,16 g (1,22 mmol) Asparaginsäure in 1 ml DMF gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 48 h bei Raumtemp. gerührt und das Produkt durch Zugabe von Ether ausgefällt. Reinigung an
 30 RP-18 (LiChroprep, 15-25 μ , H₂O:MeOH 99:1 bis 1:1) und anschließende Gefriertrocknung, sowie 24 stdg. Trocknung bei 50°C/0,01 mbar ergibt 0,27 g (51%) Produkt.

Analyse:

35	Ber.:C 54,43	H 5,54	N 5,40	O 24,68	S 6,18	K 3,77
	Gef.:C 54,04	H 5,81	N 5,22		S 6,13	K 3,85

Beispiel 2:

Darstellung von

5 2-[7-[5-[2-[(11-Carboxy-2-oxo-1,4,7,10-tetraaza-4,7,10-tri(carboxymethyl)-1-undecyl)amino]-2-oxoethyl]-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-ethyl-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, inneres Salz.

10

Zu einer Lösung von 0,5 g (0,73 mmol) 2-[7-[5-(Carboxymethyl)-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-ethyl-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-hepta-trienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium-N-succinimidylester, inneres Salz (Cytometry 11 (1990) 418-430) in 5 ml Methanol werden 43 mg (0,65 mmol) 85-proz. Hydrazin-hydrat in 1 ml Methanol langsam bei -10 °C zugetropft und 2 h bei dieser Temp. gerührt. Die Reaktionslösung wird unter Vakuum auf ca. 3 ml eingedampft, mit 1 ml Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Die ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt und an der Ölpumpe getrocknet. Man erhält 0,27 g (61%) Tricarbocyanincarbonsäurehydrazid.

20

Zu einer Lösung von 0,21 g (0,51 mmol) Diethylentriamin-pentaessigsäuremonoethylestermonoanhydrid in 20 ml DMF und 0,2 ml Triethylamin werden unter Rühren 0,27 g (0,45 mmol) des Hydrazids gegeben, das Gemisch wird 48 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Filtration wird das Lösungsmittel bei 0,2 mbar verdampft, der Rückstand mit CH₂Cl₂ verrührt, abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Produkt wird in 5 ml 3M wäßriger NaOH 4 h bei Raumtemp. gerührt, dann wird mit halbkonz. HCl auf pH 2,0 eingestellt, 1 ml Isopropanol zugefügt und die nach 18-stdg. Stehen bei 4°C erhaltenen Kristalle abgesaugt und im Hochvakuum 24 h bei 60 °C getrocknet, Ausbeute 0,23 g (52%) als dunkles, rot schimmerndes Granulat.

25

30

35

Analyse: Ber.: C 59,32 H 6,60 N 9,88 O 20,96 S 3,23
Gef.: C 54,15 H 6,70 N 9,50 S 3,19

5

Beispiel 3:

Darstellung von

2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-5-[2-[(Methoxypoly-
oxyethylen)-amino]-2-oxoethyl]-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-
2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-[2-
[(Methoxypolyoxyethylen)amino]-2-oxoethyl]-1-(4-
sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz

Zu einer Lösung von 800 mg Methoxypolyoxyethylenamin (ca.
0,16 mmol; mittlere Molmasse ca. 5000) in 10 ml CH₂Cl₂
gibt man eine Lösung von 0,08 mmol des N,N-
Disuccinimidyltesters aus Beispiel 1 in 1 ml DMF und läßt
24 h bei Raumtemperatur rühren. Der nach Zugabe von Ether
ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und
chromatographisch gereinigt (Sephadex G50 medium, H₂O als
Eluens), Ausbeute ca. 58% als grünblaues Pulver nach
Gefriertrocknung und Trocknung über P₂O₅.

mittlere Molmasse ber.: 10771, gef.: 10820

Beispiel 4:

2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-
2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-(methoxy-
polyoxyethylen)aminocarbonyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-
indolium, Natriumsalz

0,41 g (0,5 mmol) 2-[7[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-
sulfobutyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-

hepatrienyl]-3,3-dimethyl-5-carboxy-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium-N-succinimidyl ester, Natriumsalz wird zusammen mit 2,3 g Methoxypolyoxyethylenamin (0,46 mmol; mittlere Molmasse 5000) 18 h in 70 ml CH₂Cl₂ bei Raumtemperatur unter Argon gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum auf die Hälfte eingengt und das Produkt wie in Beispiel 3 beschrieben isoliert. Man erhält 2,1 g Produkt als grünblaues Pulver.

10 mittlere Molmasse ber.: 5701, gef.: 5795

Beispiel 5:

15 Darstellung von

3-(3-Carboxypropyl)-2-[7-[3-(3-carboxypropyl)-1,3-dihydro-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz.

20

6,5 g (50 mmol) Phenylhydrazin-hydrochlorid und 8,7 g (55 mmol) 5-Methyl-6-Oxoheptansäure werden 50 ml konz.

Essigsäure 1 h bei Raumtemp. und 5 h bei 120°C gerührt.

Nach Einengen wird der Rückstand mit 20 ml Wasser

25 verrührt und die entstandenen Kristalle abfiltriert und an der Ölpumpe getrocknet.

Man erhält 9,6 g (83%) bräunliche Kristalle, welche in 60 ml Dichlorbenzol suspendiert und nach Zugabe von 11,6 g (85 mmol) 1,4-Butansulton 8 h auf 150°C erhitzt werden.

30 Nach Abkühlen auf Raumtemp. werden 200 ml Aceton zugegeben und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Dieser wird in Ether suspendiert und nach 18-stdg. Rühren erneut abfiltriert und an der Ölpumpe getrocknet. Man erhält 10,7 g (70%) 3-(3-Carboxypropyl)-2,3-dimethyl-1-(4-Sulfobutyl)-3H-indolenin, welches chromatographisch

35

gereinigt wird (RP-18, LiChroprep, 15-25 μ , MeOH:H₂O als Eluens).

Die Darstellung des Indotricarbocyaninfarbstoffs erfolgt
5 durch 30 min. erhitzen von 5,0 g (13,6 mmol) Indolenin
und 1,9 g (6,8 mmol) Glutaconaldehyddianilhydrochlorid in
100 ml Essigsäureanhydrid unter Zusatz von 25 ml konz.
Essigsäure und 2,3 g (27,6 mmol) wasserfreiem
Natriumacetat auf 120°C. Der nach Zusatz von 500 ml Ether
10 erhaltene Niederschlag wird chromatographisch gereinigt
(in 1,0 g-Portionen, RP-18, LiChroprep, 15-25 μ , MeOH:H₂O
als Eluens) und abschließend gefriergetrocknet. Man
erhält 2,5 g (45%) Produkt.

15 **Analyse:**

Ber.: C 60,13 H 6,28 N 3,42 O 19,54 S 7,83 Na 2,81
Gef.: C 59,90 H 6,34 N 3,39 S 7,72 Na 2,78

20 **Beispiel 6:**

Darstellung von

2-[[[3-[[3-(3-Carboxypropyl)-1,3-dihydro-3-methyl-1-(4-
sulfobutyl)2H-indol-2-yliden)methyl]2-hydroxy-4-oxo-2-
25 cyclobuten-1-yliden)methyl]-1,1-dimethyl-3-ethyl-1H-
benz(e)indolium, inneres Salz

Zu einer auf 70 °C erhitzten Lösung von 1,36 g (8,0 mmol)
Quadratsäurediethylester und 1,6 ml Triethylamin in 12 ml
30 Ethanol werden 3,65 g (10,0 mmol) 3-Ethyl-1,1,2-
Trimethyl-1H-Benz(e)indoliumiodid gegeben. Nach 10 min.
Rühren bei 80°C wird auf 0°C abgekühlt und die
ausgefallenen, rotfarbenen Kristalle abfiltriert, mit
Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Reinigung durch
35 Chromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ : AcOH 9:1 bis 7:3)

ergibt 1,33 g (46%) 2-Ethoxy-1-[(3-Ethyl-1,1-dimethyl-1H-Benz(e)indol-2-yliden)-methyl]-cyclobuten-3,4-dion.
Dieses wird in 15 ml siedendem Ethanol suspendiert und unter Rühren mit 0,5 ml 40-proz. NaOH versetzt. Die
5 erhaltene Lösung wird 5 min. bei 80°C gerührt und nach Abkühlen auf Raumtemp. mit 5 ml 2N HCl versetzt. Das nach Einengen ausgefallene 1-[(3-Ethyl-1,1-dimethyl-1H-Benz(e)indol-2-yliden)-methyl]-2-hydroxycyclobuten-3,4-dion (1,30 g) wird filtriert, getrocknet und ohne weitere
10 Reinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt. Die Darstellung des Squarain-Farbstoffs erfolgt durch Umsetzung von 1,30 g (3,9 mmol) erhaltenen Quadratsäurederivats mit 1,43 g (3,9 mmol) 3-(3-Carboxypropyl)-2,3-dimethyl-1-(4-Sulfobutyl)-3H-indolenin. Die Komponenten werden in 80 ml Toluol und 80
15 ml 1-Butanol 18 h am Wasserabscheider erhitzt und anschließend im Vakuum von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird mit Ether versetzt und die entstandenen Kristalle nach 16 stdg. Rühren bei Raumtemp. abfiltriert
20 und chromatographisch gereinigt (RP-18, LiChroprep, 15-25 µ, MeOH:H₂O als Eluens), Ausbeute 0,95 g (36%).

Analyse: Ber.: C 68,60 H 6,20 N 4,10 O 16,40 S 4,70

Gef.: C 68,25 H 6,35 N 4,04 S 4,59

25

Beispiel 7:

Darstellung von

30 2-[7-[1,3-Dihydro-5-[2-[(2,3-dihydroxypropyl)amino]-2-oxoethyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-5-[2-[(2,3-dihydroxypropyl)amino]-2-oxoethyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz

35

2,0 g (6,4 mmol) 2,3,3-Trimethyl-3H-indol-5-yllessigsäuresuccinimidyl-ester werden in 50 ml CH₂Cl₂ mit 0,84 g (6,4 mmol) 4-Aminomethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan versetzt. Nach 5 stdg. Rühren bei Raumtemp. wird auf 100 ml Wasser gegossen, mit CH₂Cl₂ extrahiert und die org. Phasen eingeeengt. Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel CH₂Cl₂ : MeOH 98:2) erhält man 1,86 g (88%) des Amids, welches in 20 ml Dichlorbenzol mit 1,36 g (10,0 mmol) 1,4-Butansulton 7 h bei 100°C und 12 h bei Raumtemp. gerührt wird. Das nach Verrühren mit 50 ml Aceton entstandene Granulat wird abfiltriert und chromatographisch gereinigt (RP-18, LiChroprep, 15-25 µ, MeOH:H₂O als Eluens). Man erhält 0,85 g (28% bezogen auf die Ausgangsverbindung) 5-[2-[(2,2-Dimethyl-1,3-dioxa-4-cyclopentyl)methyl]amino-2-oxoethyl]-2,3,3-trimethyl-1-(4-sulfobutyl-3H-indolenin).

Die Umsetzung zum Farbstoff erfolgt in Anlehnung an Beispiel 4, indem 10 min. auf 120 °C erhitzt wird. Das Rohprodukt wird in 5 ml MeOH unter Zusatz von 100 mg p-Toluolsulfonsäure 16 h bei Raumtemp. gerührt, unlösliche Anteile werden abgetrennt und das Filtrat anschließend nach Zusatz von 3 ml Isopropanol bei -20°C aufbewahrt. Das ausgefallene Pulver wird chromatographisch gereinigt (RP-18, LiChroprep, 15-25 µ, MeOH:H₂O als Eluens), gefriergetrocknet und 24 h bei 50°C/0,01 mbar getrocknet, Ausbeute 0,32 g (37%).

Analyse:

Ber.:	C 56,70	H 6,45	N 5,88	O 20,14	S 6,73	K 4,10
Gef.:	C 56,39	H 6,88	N 5,67		S 6,58	K 3,93

Beispiel 8:

Einer narkotisierten, tumortragenden Nacktmaus (Swiss-Nude, Tumor LS 174 T an der rechten Hinterflanke) wurde
5 2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-5-(methoxycarbonyl)-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-(methoxycarbonyl)-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz in einer Dosis von 3,8 µmol/kg Körpergewicht i.v. appliziert.

10

Die laserinduzierten Fluoreszenzaufnahmen wurden vor und zu verschiedenen Zeiten nach Substanzapplikation mit einem Fluoreszenz-Imager (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin Charlottenburg) durchgeführt.

15

Die Anregung erfolgte mit monochromatischem Laserlicht bei 740 nm durch Auskopplung der Strahlung über ein Lichtleitersystem. Anregerstrahlung unterhalb 740 nm wurde durch einen Kantenfilter entfernt und das laserinduzierte Fluoreszenzlicht oberhalb 740 nm mit
20 einer CCD-Kamera (Charge Coupled Device) aufgenommen und die Daten als Schwarzweiß-Bilder gespeichert.

20

25

Die Aufnahmesequenz der Fig. 1 zeigt deutlich die allgemeine Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Substanzapplikation (Bild A, B). Nach 30 sek. ist eine gleichverteilte Intensität mit erhöhten Werten im Leber-Lunge-Bereich und Tumor zu beobachten (B). Im weiteren Zeitverlauf bis zu 1 h (C,D,E) verteilt sich die Substanz zunehmend im Tier. Nach 18 h ist im Tumor (rechte
30 Hinterflanke) eine gegenüber dem Restkörper deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität zu beobachten.

30

35

Die Figur 1 zeigt Fluoreszenzlichtaufnahmen (Schwarzweiß-Bild) einer Nacktmaus (Swiss-Nude) zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Applikation von 3,8 µmol/kg Körpergewicht 2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-5-

(methoxycarbonyl)-1-(4-sulfobutyl)-2*H*-indol-2-yliden]-
1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-(methoxycarbonyl)-1-
(4-sulfobutyl)-3*H*-indolium, Natriumsalz

A-E: rechtslaterale Aufnahmen, F: posteriore Aufnahme

- 5 A: vor Applikation,
 B: 30 sek.,
 C: 1 min,
 D: 10 min,
 E: 1 h nach Applikation,
10 F: 18 h nach Applikation.

15

20

25

30

35

Patentansprüche

1. Verfahren zur In-vivo-Diagnostik mittels NIR-Strahlung, indem man Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

- l für eine Zahl 0 - 6, n für eine Zahl 0 - 10 und m für die Zahl 1 - 100 steht,

B eine biologische Erkennungseinheit mit einem Molekulargewicht bis zu 30000, welche sich an bestimmte Zellpopulationen oder spezifisch an Rezeptoren bindet oder sich in Geweben oder Tumoren anreichert oder überwiegend im Blut verbleibt oder ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül ist,

F einen Farbstoff darstellt, welcher Absorptionsmaxima im Bereich von 650 bis 1200 nm aufweist,

W eine hydrophile Gruppe darstellt, welche die Wasserlöslichkeit verbessert, wobei der n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der Verbindung der Formel I kleiner oder gleich 2,0 ist unter der Maßgabe, daß l = 0 ist

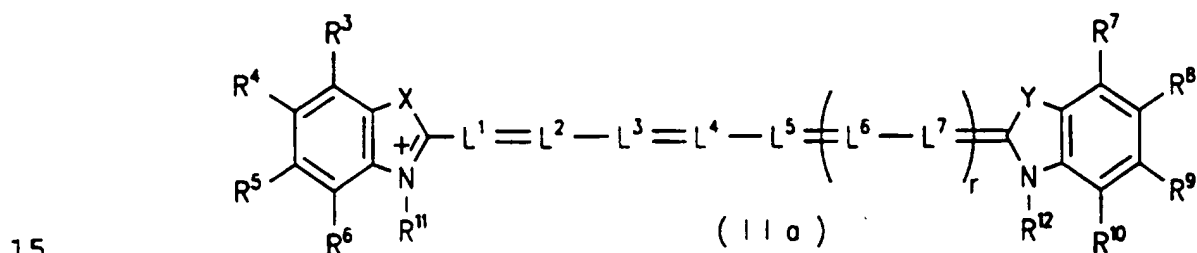
sowie deren physiologisch verträgliche Salze verwendet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I B eine Aminosäure, ein Peptid, CDR (complementarity determining region),

ein Antigen, ein Hapten, ein Enzymsubstrat, ein Enzym-Cofaktor, Biotin, ein Carotinoid, ein Hormon, ein Neurohormon, ein Neurotransmitter, ein Wachstumsfaktor, ein Lymphokin, ein Lectin, ein Toxin, ein Kohlenhydrat, ein Oligosaccharid, ein Polysaccharid, ein Dextran, ein Oligonukleotid oder ein rezeptorenbindendes Arzneimittel ist.

3. Verfahren nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I F

einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel IIa



darstellt,

worin

r die Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet, mit der Maßgabe, daß für r = 2 die jeweiligen doppelt vorkommenden Fragmente L⁶ und L⁷ gleich bzw. unterschiedlich sein können.,

L¹ bis L⁷ gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander ein Fragment CH oder CR darstellen,

wobei

R ein Halogenatom, eine Hydroxy-, Carboxy-, Acetoxy-, Amino-, Nitro-, Cyano- oder Sulfonsäure-Gruppe oder ein Alkyl-, Alkenyl-, Hydroxyalkyl-, Carboxyalkyl-, Alkoxy-, Alkoxycarbonyl-, Sulfoalkyl, Alkylamino-, Dialkylamino- oder Halogenalkyl-Rest mit bis

zu 6 Kohlenstoffatomen, ein Aryl-, Alkylaryl-, Hydroxyaryl-, Carboxyaryl-, Sulfoaryl-, Arylamino-, Diarylamino-, Nitroaryl- oder Halogenaryl-Rest mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen ist oder wobei R eine Bindung darstellt, welche an einen anderen Rest R bindet und zusammen mit den dazwischen liegenden Resten L¹-L⁷ einen 4- bis 6-gliedrigen Ring bildet oder wobei R an zwei verschiedenen Positionen jeweils eine Bindung darstellt, welche über ein Fragment -CO- verbunden sind,

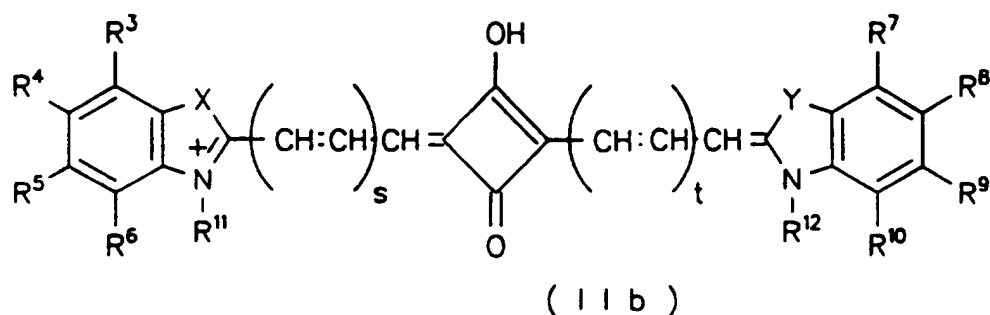
R³ bis R¹² gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Rest B oder W mit der oben angegebenen Bedeutung, oder ein Alkyl-Rest oder Alkenyl-Rest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder ein Aryl- oder Aralkyl-Rest mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen ist, wobei der Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder Aralkylrest gegebenenfalls mit einem Rest W mit der oben angegebenen Bedeutung substituiert ist, oder wobei an jeweils zwei einander benachbarten Resten R³ bis R¹⁰ unter Berücksichtigung der dazwischenliegenden C-Atome 5- bis 6-gliedrige Ringe anneliert sind, welche gesättigt, ungesättigt oder aromatisch sind und gegebenenfalls einen Rest R mit der oben angegebenen Bedeutung tragen,

X und Y gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander ein O, S, Se oder Te bedeuten oder ein Fragment -C(CH₃)₂-, -CH=CH- oder -CR¹³R¹⁴- darstellen,

wobei R^{13} und R^{14} unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Rest B oder W mit der oben angegebenen Bedeutung oder ein Alkyl-Rest oder ein Alkenyl-Rest mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder ein Aryl- oder Aralkyl-Rest mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen ist,

wobei der Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder Aralkylrest gegebenenfalls mit einem Rest W mit der oben angegebenen Bedeutung substituiert ist,

einen Squarain-Farbstoff der allgemeinen Formel II b



darstellt
worin

20

s und t unabhängig voneinander für die Ziffern 0 oder 1 stehen, mit der Maßgabe, daß s und t nicht gleichzeitig 1 bedeuten,

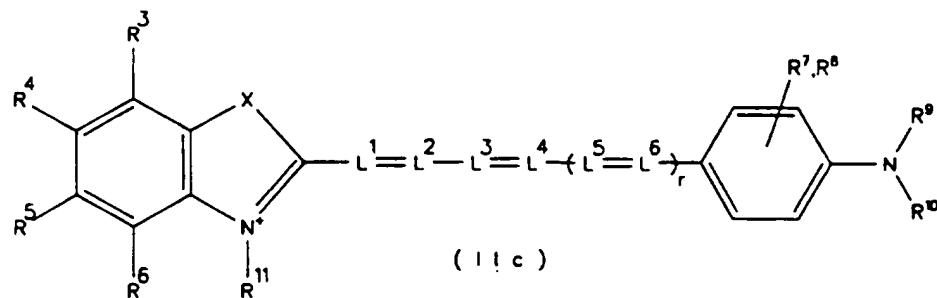
25

R^3 bis R^{12} , x und y die oben angegebene Bedeutung haben

einen Styryl-Farbstoff der allgemeinen Formel II c

30

41



darstellt,

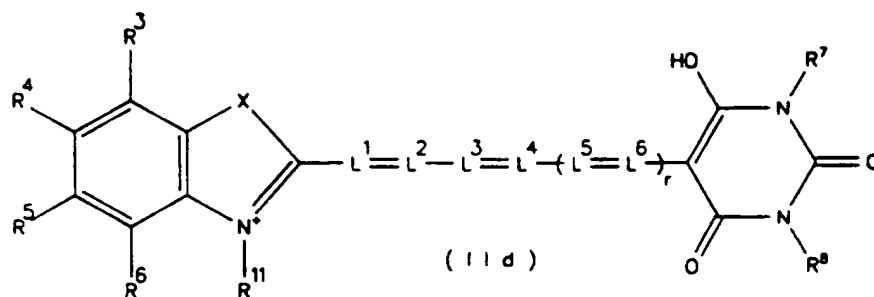
5

worin

r, L¹ bis L⁶, R³ bis R¹¹ und X die oben
angegebene Bedeutung haben,

10

oder einen Merocyanin-Farbstoff der allgemeinen
Formel II d



15

darstellt,

worin

20

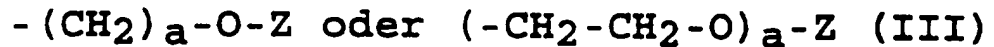
r, L¹ bis L⁶, R³ bis R⁸, R¹¹ und X die oben
angegebene Bedeutung haben und G ein
Sauerstoff- oder Schwefelatom darstellt.

25

4. Verfahren nach mindestens einem der voranstehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der
allgemeinen Formel I W eine Carboxy- oder

Sulfonsäure-Gruppe oder eine Carboxyalkyl-Gruppe oder eine Alkoxy-carbonyl- oder eine Alkoxyoxoalkyl-Gruppe mit bis zu 12 Kohlenstoffatomen ist,

5 einen Rest der allgemeinen Formeln III



bedeutet,

10

worin

a für die Zahl 0 bis 6 steht

Z ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest mit 3

bis 6 C-Atomen, welcher 2 bis n-1 Hydroxygruppen aufweist, wobei n die Anzahl der C-Atome ist oder

15

ein mit 2 bis 4 Hydroxygruppen substituierter

Aryl- oder Alkylrest mit 6 bis 10 C-Atomen oder

ein mit 1 bis 3 Carboxygruppen substituierter

Alkylrest mit 1 bis 6 C-Atomen oder ein mit 1 bis

3 Carboxylgruppen substituierter Arylrest mit 6

20

bis 9 C-Atomen oder ein mit 1 bis 3

Carboxygruppen substituierter Arylalkylrest oder

ein Nitroaryl bzw. ein Nitroalkylrest mit 6 bis

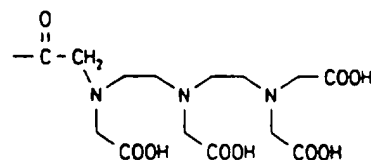
15 C-Atomen oder ein Sulfoalkylrest mit 2 bis 4

C-Atomen bedeutet,

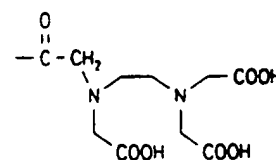
25

oder einen Rest der allgemeinen Formeln III a

oder III b



(III a)

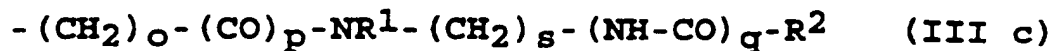


(III b)

30

darstellt

oder einen Rest der allgemeinen Formel III c



5 bedeutet,

worin

o und s unabhängig voneinander für die Zahlen

0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 stehen,

p und q unabhängig voneinander 0 oder 1

10 bedeuten,

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen

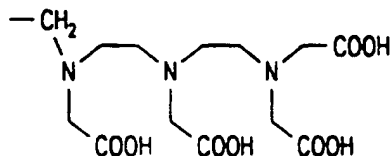
Rest Z mit der oben angegebenen Bedeutung mit

Ausnahme der Substituenten der allgemeinen

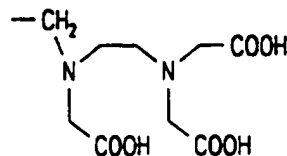
Formeln III a und III b stehen oder

15 unabhängig voneinander für einen Rest der

allgemeinen Formeln III d oder III e



(III d)



(III e)

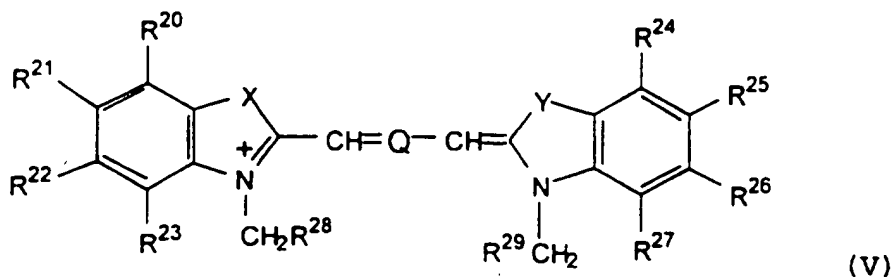
20

stehen, unter der Maßgabe, daß p und q = 1
sind,

25 oder ein Rest der allgemeinen Formel III c mit der
oben angegebenen Bedeutung ist.

5. Cyaninfarbstoffe der allgemeinen Formel V

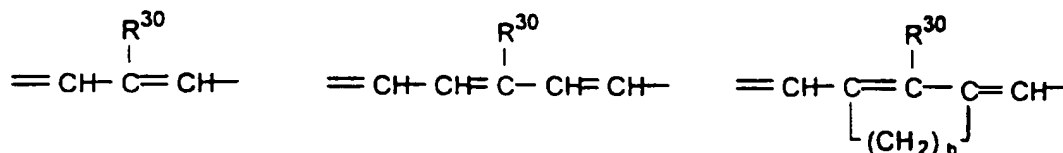
30



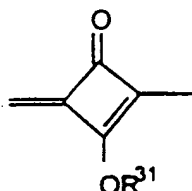
wobei

Q ein Fragment

5



oder



ist,

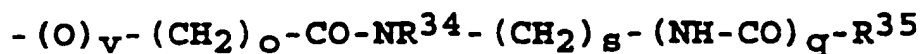
wobei R^{30} für ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carboxygruppe, einen Alkoxyrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder ein Chloratom steht, b eine ganze Zahl 2 oder 3 bedeutet, R^{31} für ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht,

X und Y unabhängig voneinander für ein Fragment -O-, -S-, -CH=CH- oder -C(CH₂R³²)(CH₂R³³)- stehen,

R^{20} bis R^{29} , R^{32} und R^{33} unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, einen Carboxy-, einen Sulfonsäure-Rest oder einen Carboxyalkyl-, Alkoxy-carbonyl oder Alkoxyoxoalkyl-Rest mit bis zu 10 C-Atomen oder ein Sulfoalkylrest mit bis zu 4 C-Atomen,

oder für ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül,

oder für einen Rest der allgemeinen Formel VI



(VI)

5 steht,

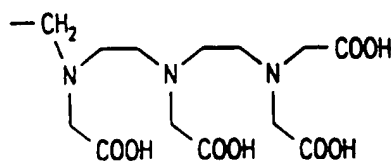
mit der Maßgabe, daß bei der Bedeutung von X und Y
gleich O, S, -CH=CH- oder -C(CH₃)₂- mindestens einer
der Reste R²⁰ bis R²⁹ einem nicht spezifisch
10 bindenden Makromolekül oder der allgemeinen Formel VI
entspricht,

wobei

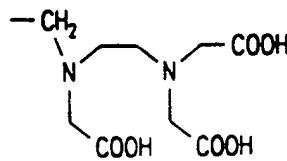
o und s gleich 0 sind oder unabhängig voneinander
für eine ganze Zahl von 1 bis 6 stehen,
15 q und v unabhängig voneinander für 0 oder 1
stehen,

R³⁴ ein Wasserstoffatom oder einen Methylrest
darstellt,

R³⁵ ein Alkylrest mit 3 bis 6 C-Atomen, welcher 2
20 bis n-1 Hydroxygruppen aufweist, wobei n die
Anzahl der C-Atome ist, oder ein mit 1 bis 3
Carboxygruppen substituierter Alkylrest mit 1 bis
6 C-Atomen, Arylrest mit 6 bis 9 C-Atomen oder
Arylalkylrest mit 7 bis 15 C-Atomen, oder ein
25 Rest der allgemeinen Formel IIIId oder IIIe



(IIIId)



(IIIe)

ist,

unter der Maßgabe, daß q für 1 steht,

oder ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül bedeutet,

- 5 R²⁰ und R²¹, R²¹ und R²², R²² und R²³, R²⁴ und R²⁵,
R²⁵ und R²⁶, R²⁶ und R²⁷ zusammen mit den zwischen
ihnen liegenden Kohlenstoffatomen einen 5- oder 6-
gliedrigen aromatischen oder gesättigten annelierten
Ring bilden,
sowie deren physiologisch verträgliche Salze.
- 10 6. Cyaninfarbstoff nach Anspruch 5, nämlich
- 15 5-[2-[(1,2-Dicarboxyethyl)amino]-2-oxoethyl]-2-[7-[5-
[2-(1,2-dicarboxyethyl)amino]-2-oxoethyl]-1,3-
dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-
yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-
sulfobutyl)-3H-indolium, inneres Salz,
Monokaliumsalz,
- 20 2-[7-[5-[2-[(11-Carboxy-2-oxo-1,4,7,10-tetraaza-
4,7,10-tri(carboxymethyl)-1-undecyl)amino]-2-
oxoethyl]-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-ethyl-2H-indol-
2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-1-(4-
sulfobutyl)-3H-indolium, inneres Salz,
- 25 2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-5-[2-[(Methoxypolyoxy-
ethylen)-amino]-2-oxoethyl]-1-(4-sulfobutyl)-2H-
indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-
[2-[(methoxypolyoxyethylen)amino]-2-oxoethyl]-1-(4-
30 sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz,
- 35 2-[7-[1,3-Dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-
indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3,3-dimethyl-5-
(Methoxypolyoxyethylen)aminocarbonyl-1-(4-
sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz

3-(3-Carboxypropyl)-2-[7-[3-(3-carboxypropyl)-1,3-dihydro-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz,

5

2-[[3-[[3-(3-Carboxypropyl)-1,3-dihydro-3-methyl-1-(4-sulfobutyl)2H-indol-2-yliden]methyl]2-hydroxy-4-oxo-2-cyclobuten-1-yliden]methyl]-1,1-dimethyl-3-ethyl-1H-benz(e)indolium, inneres Salz,

10

2-[7-[1,3-Dihydro-5-[2-[(2,3-dihydroxypropyl)amino]-2-oxoethyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-yliden]-1,3,5-heptatrienyl]-5-[2-[(2,3-dihydroxypropyl)amino]-2-oxoethyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium, Natriumsalz

15

7. Verwendung von Cyaninfarbstoffen nach Anspruch 5 oder 6 zur In-vivo-Diagnostik mittels NIR-Strahlung.

20

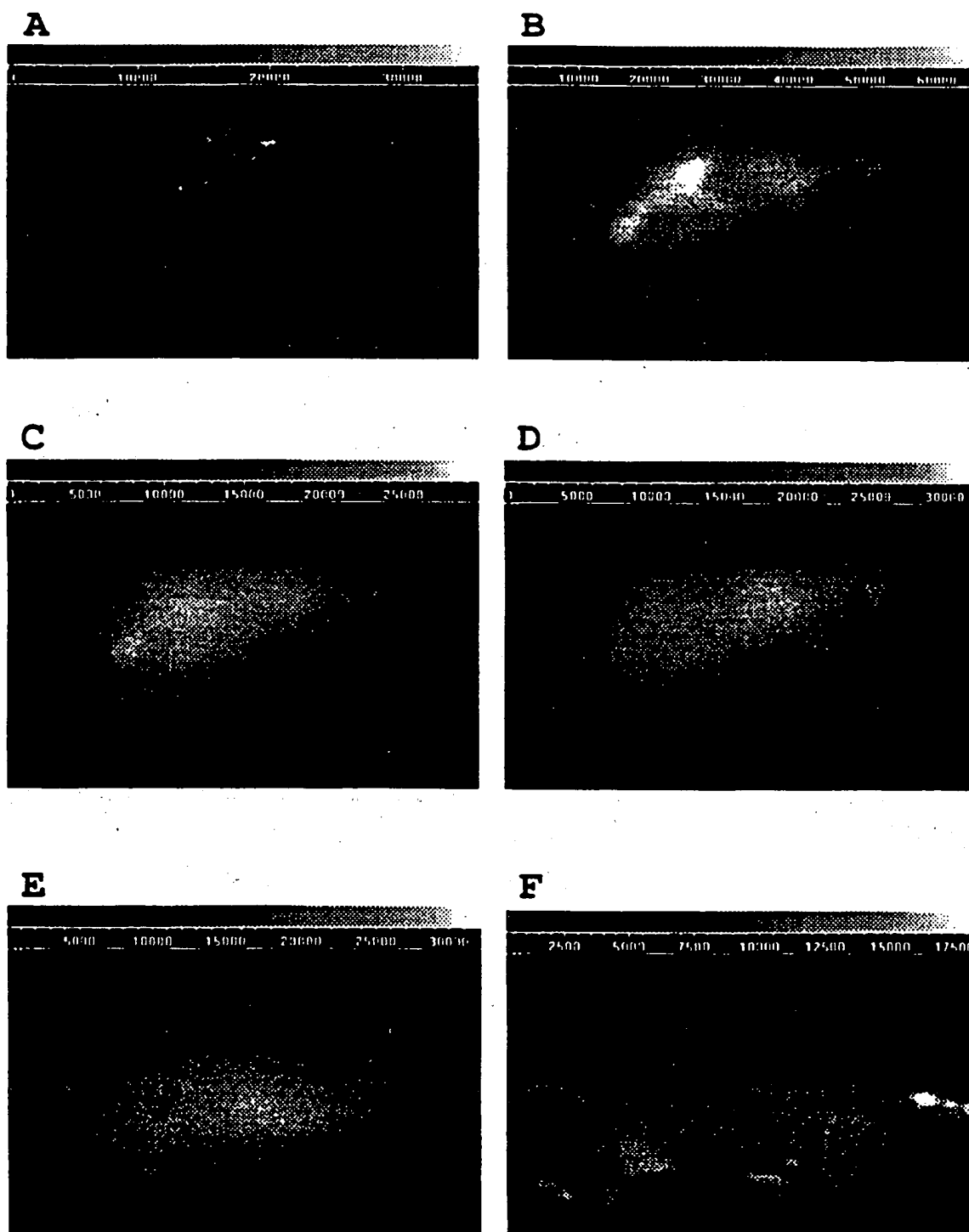
8. Mittel zur In-vivo-Diagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens einen der Cyaninfarbstoffe nach Anspruch 5 oder 6 zusammen mit den üblichen Hilfs- und Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthält.

25

30

35

Fig. 1



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. FLUORESC. (1993), 3(3), 153-5 CODEN: JOFLN; ISSN: 1053-0509, 1993 TERPETSCHNIG, EWALD ET AL 'An investigation of squaraines as a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission' see page 154, column 2, paragraph 2; figure 1 --- -/--	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 1996

Date of mailing of the international search report

1. 03. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2220 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ANALYTICAL CHEMISTRY, 1993 COLUMBUS US, pages 1742-1748, TERPETSCHNIG, EWALD ET AL 'Synthesis, spectral properties and photostabilities of symmetrical and unsymmetrical squaraines;a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission' see page 1743, column 1, paragraph 2; figure 1; tables 1,2,4 see page 1746, column 1, paragraph 2 see page 1742, column 2, paragraph 3 ---</p>	5-8
X	<p>WO,A,89 10758 (ZYNAXIS TECHNOLOGIES INC) 16 November 1989 see page 13, line 13 - page 14, line 13 see page 18, line 5 - line 34; claims 8-16 see page 30 - page 35 ---</p>	5-8
X	<p>WO,A,91 18006 (DIATRON CORP) 28 November 1991 see page 8, line 31 - page 9, line 10 see page 14, line 9 - line 37 see page 16, line 10 - line 25 see page 29; claims 1,23; example F ---</p>	1
X	<p>WO,A,92 00748 (ENZON INC) 23 January 1992 see page 1, line 9 - line 20; claims see page 47, line 30 - page 48, line 3 ---</p>	1,2
X	<p>BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 4, no. 2, April 1993 WASHINGTON US, pages 105-111, RATNAKAR B. MUJUMDAR ET AL. 'CYANINE DYE LABELING REAGENTS: SULFOINDOCYANINE SUCCINIMIDYL ESTERS.' cited in the application see page 106, column 2, line 7 - line 20 see page 106, column 1, line 1 - line 3 ---</p>	1-8
A	<p>DE,A,41 36 769 (HÜMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) 6 May 1993 cited in the application see claim 1 ---</p>	1
P,X	<p>DE,A,43 23 368 (DOMSCHKE WOLFRAM ;FOERSTER ERNST PRIV DOZ DR MED (DE); KELLER RALF) 19 January 1995 see column 2, line 2 - line 55; claims 1,4-6 ---</p>	1

-/--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANCER RESEARCH, vol. 54, 15 May 1994 MD US, pages 2643-2649, SILVIO FOLLI ET AL. 'ANTIBODY-INDOCYANIN CONJUGATES FOR IMMUNOPHOTODETECTION OF HUMAN SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN NUDE MICE.' cited in the application see page 2643, column 1, paragraph 1 ---	1-3,5-8
X	ANAL. CHIM. ACTA (1993), 282(3), 633-41 CODEN: ACACAM;ISSN: 0003-2670, 1993 TERPETSCHNIG, EWALD ET AL 'Synthesis, spectral properties and photostabilities of symmetrical and unsymmetrical squaraines;a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission' see page 636; figure 1 -----	5-8

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8910758	16-11-89	AU-B- 641361	23-09-93
		AU-B- 3968589	29-11-89
		EP-A- 0430968	12-06-91
		JP-T- 4502755	21-05-92
		US-A- 5256532	26-10-93
		US-A- 5385822	31-01-95
WO-A-9118006	28-11-91	CA-A- 2082936	16-11-91
		EP-A- 0529002	03-03-93
		US-A- 5403928	04-04-95
WO-A-9200748	23-01-92	US-A- 5455027	03-10-95
		US-A- 5219564	15-06-93
		US-A- 5372807	13-12-94
DE-A-4136769	06-05-93	NONE	
DE-A-4323368	19-01-95	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
 IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. FLUORESC. (1993), 3(3), 153-5 CODEN: JOFLEN; ISSN: 1053-0509, 1993 TERPETSCHNIG, EWALD ET AL 'An investigation of squaraines as a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission' siehe Seite 154, Spalte 2, Absatz 2; Abbildung 1 --- -/--	1-8



Weitere Veröffentlichungen und der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Februar 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01.03.96

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>ANALYTICAL CHEMISTRY, 1993 COLUMBUS US, Seiten 1742-1748, TERPETSCHNIG, EWALD ET AL 'Synthesis, spectral properties and photostabilities of symmetrical and unsymmetrical squaraines;a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission' siehe Seite 1743, Spalte 1, Absatz 2; Abbildung 1; Tabellen 1,2,4 siehe Seite 1746, Spalte 1, Absatz 2 siehe Seite 1742, Spalte 2, Absatz 3</p> <p>---</p>	5-8
X	<p>WO,A,89 10758 (ZYNAXIS TECHNOLOGIES INC) 16.November 1989 siehe Seite 13, Zeile 13 - Seite 14, Zeile 13 siehe Seite 18, Zeile 5 - Zeile 34; Ansprüche 8-16 siehe Seite 30 - Seite 35</p> <p>---</p>	5-8
X	<p>WO,A,91 18006 (DIATRON CORP) 28.November 1991 siehe Seite 8, Zeile 31 - Seite 9, Zeile 10 siehe Seite 14, Zeile 9 - Zeile 37 siehe Seite 16, Zeile 10 - Zeile 25 siehe Seite 29; Ansprüche 1,23; Beispiel F</p> <p>---</p>	1
X	<p>WO,A,92 00748 (ENZON INC) 23.Januar 1992 siehe Seite 1, Zeile 9 - Zeile 20; Ansprüche siehe Seite 47, Zeile 30 - Seite 48, Zeile 3</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 4, Nr. 2, April 1993 WASHINGTON US, Seiten 105-111, RATNAKAR B. MUJUMDAR ET AL. 'CYANINE DYE LABELING REAGENTS: SULFOINDOCYANINE SUCCINIMIDYL ESTERS.' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 106, Spalte 2, Zeile 7 - Zeile 20 siehe Seite 106, Spalte 1, Zeile 1 - Zeile 3</p> <p>---</p>	1-8
A	<p>DE,A,41 36 769 (HÜMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) 6.Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Anspruch 1</p> <p>---</p>	1

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	DE,A,43 23 368 (DOMSCHKE WOLFRAM ;FOERSTER ERNST PRIV DOZ DR MED (DE); KELLER RALF) 19.Januar 1995 siehe Spalte 2, Zeile 2 - Zeile 55; Ansprüche 1,4-6 ---	1
X	CANCER RESEARCH, Bd. 54, 15.Mai 1994 MD US, Seiten 2643-2649, SILVIO FOLLI ET AL. 'ANTIBODY-INDOCYANIN CONJUGATES FOR IMMUNOPHOTODETECTION OF HUMAN SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN NUDE MICE.' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2643, Spalte 1, Absatz 1 ---	1-3,5-8
X	ANAL. CHIM. ACTA (1993), 282(3), 633-41 CODEN: ACACAM;ISSN: 0003-2670, 1993 TERPETSCHNIG, EWALD ET AL 'Synthesis, spectral properties and photostabilities of symmetrical and unsymmetrical squaraines;a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission' siehe Seite 636; Abbildung 1 -----	5-8

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-8910758	16-11-89	AU-B- 641361	23-09-93
		AU-B- 3968589	29-11-89
		EP-A- 0430968	12-06-91
		JP-T- 4502755	21-05-92
		US-A- 5256532	26-10-93
		US-A- 5385822	31-01-95

WO-A-9118006	28-11-91	CA-A- 2082936	16-11-91
		EP-A- 0529002	03-03-93
		US-A- 5403928	04-04-95

WO-A-9200748	23-01-92	US-A- 5455027	03-10-95
		US-A- 5219564	15-06-93
		US-A- 5372807	13-12-94

DE-A-4136769	06-05-93	KEINE	

DE-A-4323368	19-01-95	KEINE	
